

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

550102

(43) 国際公開日
2004 年 10 月 7 日 (07.10.2004)

PCT

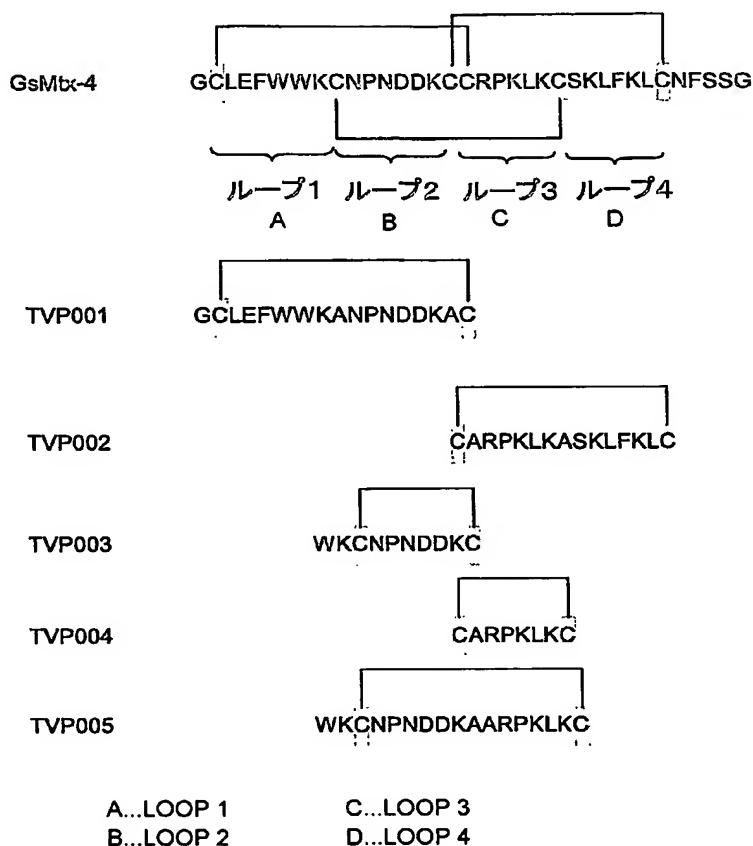
(10) 国際公開番号
WO 2004/085647 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/12, C07K 14/435, A61K 38/08, 38/10, A61P 9/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/004190
- (22) 国際出願日: 2004 年 3 月 25 日 (25.03.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2003-085666 2003 年 3 月 26 日 (26.03.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ファルマデザイン (PHARMADESIGN, INC.) [JP/JP]; 〒1040032 東京都中央区八丁堀 2 丁目 1 9 番 8 号 長谷工八丁堀ビル 6 階 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 横田川 高峰 (YOKOTAGAWA, Takane) [JP/JP]; 〒1040032 東京都中央区八丁堀 2 丁目 1 9 番 8 号 長谷工八丁堀ビル 6 階 株式会社ファルマデザイン内 Tokyo (JP). 曾我部 正博 (SOKABE, Masahiro) [JP/JP]; 〒4660065 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町 6 5 名古屋大学大学院医学研究科 細胞生物物理学研究室 Aichi (JP). 古谷 利夫 (FURUYA, Toshio) [JP/JP]; 〒1040032 東京都中央区八丁堀 2 丁目 1 9 番 8 号 長谷工八丁堀ビル 6 階 株式会社ファルマデザイン内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 小林 浩, 外 (KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲 2 丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,

[続葉有]

(54) Title: LOW-MOLECULAR WEIGHT PEPTIDES INHIBITING ION CHANNEL ACTIVITY

(54) 発明の名称: イオンチャネルの活性を阻害する低分子ペプチド



(57) Abstract: It is intended to provide novel polypeptides which specifically inhibit the activity of a mechano-sensitive channel; and mechano-sensitive channel inhibitors or remedies for atrial fibrillation containing these polypeptides or salts thereof. The above objects can be achieved by using polypeptides having amino acid sequences represented by SEQ ID NO:1 (TVP003), SEQ ID NO:2 (TVP004) and SEQ ID NO:3 (TVP005), salts of these polypeptides, and mechano-sensitive channel inhibitors or remedies for atrial fibrillation containing the same.

(57) 要約: 本発明は、機械刺激感受性チャネルの活性を特異的に阻害する新規ポリペプチド、このようなポリペプチド、またはその塩を含有する機械刺激感受性チャネル阻害剤、心房細動の治療薬を提供することを課題とする。上記課題は、配列番号 1 (TVP003)、配列番号 2 (TVP004)、または配列番号 3 (TVP005) で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩や、これらを含む機械刺激感受性チャネル阻害剤、心房細動の治療薬などにより解決される。



BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

イオンチャネルの活性を阻害する低分子ペプチド

5 技術分野

この発明は、機械刺激感受性チャネル阻害活性を有するポリペプチド、このポリペプチドを含む機械刺激感受性チャネル阻害剤および心房細動の治療剤などに関するものである。より詳しくは、本発明は、クモ毒由来の天然ペプチド (GsMTx-4) の配列をベースにして機械刺激感受性チャネルに作用するファーマコフォアを特定し、そのファーマコフォアを構成するようにデザインされ、かつ心房細動の治療に有用な新規ポリペプチドなどに関する。

背景技術

15 心房細動は、不整脈の一種であり、加齢とともにその有病率が高くなる。心房細動は、高齢者 (65 歳以上) の約 3 % に認められる心臓疾患である。心房細動が慢性化すると、血栓を形成して脳塞栓症を引き起こすため、現在では心房細動が重症脳卒中患者の主要な原因疾患と考えられている。このように心房細動は、脳梗塞などの合併症の発生頻度と重症度

20 度を考慮し、近年致死性不整脈のひとつとして認識されるようになった (J. Nippon. Med. Sch. 2002, 69 (3))。これまでに心房細動を根治するような治療薬は得られておらず、心房細動、特に慢性心房細動に対する薬物療法には限界があると考えられていた (同前)。

25 心房細動は、心筋に存在するイオンチャネルの働きの異常が原因のひとつと考えられている。一方、クモ毒由来の天然ペプチド (GsMTx-4: 配列番号 4) が、機械刺激感受性チャネル (Stretch-Activated Channel: SAC) の活性を阻害することが知られている (例えば、Thomas M. Suchyna et. al., Identification of a Peptide Toxin from Grammostola

30 Spatulata Spider Venom that Blocks Cation-selective

Stretch-activated Channels, J. Gen. Physiol., Vol. 115, pp583-598, 2000 (非特許文献1) 参照)。また、同文献には、陸上及び水中の動物由来の毒液由来の毒素を構成するペプチドには、6つのシステインを含むICK (Inhibitor Cysteine Knot: インヒビターシステインノット) モチーフが共通して見出されることが記載されている (非特許文献1の590頁右欄下から7行目~下から3行目、および図30)。また、同文献には、GsMTx-4が、3つのシステインペア (C_1-C_4 、 C_2-C_5 及び C_3-C_6) によって定義される基本構造を有するICKモチーフを有することが示唆されている (非特許文献1の595頁左欄7行目から下から11行目、「GsMTx-4の構造」の欄)。

また、GsMTx-4を抽出・精製等する方法や、そのGsMTx-4を用いて心臓不整脈を治療する方法などが提案されている (例えば、Bode et al, nature, Vol. 409, pp35-36, 2001. (非特許文献2)、米国特許出願公開第2002/0077286号明細書 (特許文献1) 参照。)。また、GsMTx-4の構造は、NMRを用いた溶液中での結果が知られている (Robert et. al, J. Biol. Chem. Vol37, pp3443-34450, 2002. (非特許文献3) 参照。)。このような知見にかかわらず、クモ毒由来のペプチド (GsMTx-4) を用いた心房細動の治療剤は、開発されていなかった。

20 参考文献

特許文献1 : 米国特許出願公開第2002/0077286号明細書 ;

非特許文献1 : Thomas M. Suchyna et. al., Identification of a Peptide Toxin from Grammostola Spatulata Spider Venom that Blocks Cation-selective Stretch-activated Channels, J. Gen. Physiol., Vol. 115, pp583-598, 2000 ;

非特許文献2 : Bode et al, nature, Vol. 409, pp35-36, 2001 ;

非特許文献3 : Robert et. al, J. Biol. Chem. Vol37, pp3443-34450, 2002.

本発明では、GsMTx-4 のファーマコフォア（活性に必要最低限の空間構造）を同定し、ファーマコフォア情報に基づいて機械刺激感受性チャネルの活性を特異的に阻害する新規ポリペプチドを設計し、このようなポリペプチドを含む心房細動の治療剤などを提供することを目的とする。

5

発明の開示

上記課題は、以下の発明により解決される。

[1] 本発明の第1の実施態様に係る発明は、「配列番号1、配列番号2、または配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、
10 または当該ポリペプチドの塩である。これらのポリペプチドは、本明細書の実施例で確認されたとおり、機械刺激感受性チャネル阻害活性を有するポリペプチドであり、GsMTx-4 のファーマコフォアを構成するポリペプチドであると考えられる。これらのポリペプチドは、心房細動の治療などに有用である。

15 [2] 本発明の第2の実施態様に係る発明は、「配列番号1、配列番号2、または配列番号3で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩」である。

[3] 本発明の第3の実施態様に係る発明は、「配列番号16、または配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、または
20 当該ポリペプチドの塩」である。これらのポリペプチドは、本明細書の実施例で確認されたとおり、機械刺激感受性チャネル阻害活性を有するポリペプチドである。これらのポリペプチドは、心房細動の治療などに有用である。

[4] 本発明の第4の実施態様に係る発明は、「配列番号1、配列番号2、または配列番号3で表されるアミノ酸配列において、1若しくは
25 数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号4に記載のアミノ酸配列からなるものではなく、かつ機械刺激感受性チャネル阻害活性を有するポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩」である。

30 [5] 本発明の第5の実施態様に係る発明は、前記「配列番号1、配

列番号 2、または配列番号 3 で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列からなるものではなく、かつ機械刺激感受性チャネル阻害活性を有するポリペプチド」が、配列番号 16、または配列番号 17 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである上記 [4] に記載のポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩である。

[6] 本発明の第 6 の実施態様に係る発明は、「上記 [1]、上記 [3]、又は上記 [4] に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド」である。

[7] 本発明の第 7 の実施態様に係る発明は、「上記 [6] に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター」である。

[8] 本発明の第 8 の実施態様に係る発明は、「上記 [7] に記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体」である。

[9] 本発明の第 9 の実施態様に係る発明は、「上記 [1]～上記 [5] のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩のうちいずれか 1 つ以上を含有する機械刺激感受性チャネル阻害剤」である。この阻害剤は、機械刺激感受性チャネルの活性を特異的に阻害するので、機械刺激感受性チャネルの研究などに有効に用いられる。

[10] 本発明の第 10 の実施態様に係る発明は、「上記 [1]～上記 [5] のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩のうちいずれか 1 つ以上を含有する心房細動の治療剤」である。これらのポリペプチドは、本明細書の実施例で、その機能が確認されたとおり、機械刺激感受性チャネル阻害活性を有する。したがって、この治療剤は、心房細動の治療に有効に用いることができる。

図面の簡単な説明

図 1 は、GsMTx-4 と相同性の高い 10 の候補マルチプルアライメントの結果を示す図である。

図 2 は、1QK6 と GsMTx-4 とのアラインメントの結果を示す。

図 3 は、Huwentoxin-I と GsMTx-4 を重ね合わせたステレオ図である。

図 4 は、Huwentoxin-I と GsMTx-4 を重ね合わせたモデルの C α トレースを示す。図 4 中、薄い線は鑄型を表し、濃い線は GsMTx-4 を表す。

図 5 は、Huwentoxin-I で活性中心と考えられる Arg20 近傍を表す図である。図 5 中、薄い線は huwentoxin-I を表し、濃い線は GsMTx-4 を表す。

図 6 (a) ~ 図 6 (d) は、Huwentoxin-I (PDB code: 1QK6) を鑄型としたモデルの表面構造を表す図である。図 6 (a) ~ 図 6 (d) において、左が huwentoxin-I、右が GsMTx-4 を表す。図 6 (a) は、hydrophobic patch から見たもの（上の図とほぼ同じ向き）を表す。図 6 (b) は、x 軸の
10 周りに +90° 回転したものを表す。図 6 (c) は、y 軸の周りに +90° 回転したものを表す。図 6 (d) は、y 軸の周りに 180° 回転したものを表す。

図 7 は、GsMTx-4 の構造およびデザインしたペプチドの構造を表す。

図 8 は、TVP003 の阻害活性検査結果を示す図である。図 8 (a) は、
15 単一チャネル電流の計測結果を表す。図 8 (b) は、チャネルの開確立 (P o) を表す。

図 9 は、TVP004 の阻害活性検査結果を示す図である。図 9 (a) は、単一チャネル電流の計測結果を表す。図 9 (b) は、チャネルの開確立 (P o) を表す。

20 図 10 は、TVP005 の阻害活性検査結果を示す図である。図 10 (a) は、単一チャネル電流の計測結果を表す。図 10 (b) は、チャネルの開確立 (P o) を表す。

図 11 は、TVP017 の阻害活性検査結果を示す図である。図 11 (a) は、単一チャネル電流の計測結果を表す。図 11 (b) は、チャネルの
25 開確立 (P o) を表す。

図 12 は、TVP019 の阻害活性検査結果を示す図である。図 12 (a) は、単一チャネル電流の計測結果を表す。図 12 (b) は、チャネルの開確立 (P o) を表す。

図 13 は、活性ペプチドの機械刺激感受性チャネルに対する特異性の
30 検討結果を示すグラフである。図 13 (a) は、TVP0003 の心筋 SA チャ

ネルに関する単一チャネル電流の測定結果を示すグラフである。図 1 3 (b) は、TVP0003 の STREX-deletion-mutant に関する単一チャネル電流の測定結果を示すグラフである。図 1 3 (c) は、チャネルの開確立 (P o) を表すグラフである。

5

発明を実施するための最良の形態

(本発明のポリペプチド)

本発明のポリペプチドは、配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；配列番号 1 6、または配列番号 1 7 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3 で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列からなるものではなく、かつ機械刺激感受性チャネル阻害活性を有するポリペプチド（すなわち、本発明の第 1 ～ 第 5 の実施態様に係る発明に関するポリペプチド）である。

また、本発明のペプチドは、C 末端がカルボキシル基 ($-COOH$)、カルボキシレート ($-COO^-$)、アミド ($-CONH_2$) またはエステル ($-COOR$) などであってもよい。

本発明のペプチドには、N 末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているものも含まれる。本発明のペプチドには、N 端側が生体内で切断され生成した Gln がピログルタミン酸化したものも含まれる。本発明のペプチドには、側鎖上の置換基が、適当な保護基で保護されているものも含まれる。本発明のペプチドには、糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドも含まれる。

本発明のペプチドの塩における「塩」としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、好ましくは生理学的に許容される酸付加塩である。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、

30

ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが挙げられる。

5 (本発明のポリペプチドの合成)

本発明のポリペプチドは、化学的に合成してもよいし、組換えDNA技術を用いて製造してもよい。本発明のポリペプチドを化学的に合成するためには、公知の方法に従って合成すればよく、例えば、アジド法、
10 酸クロライド法、酸無水物法、混酸無水物法、DCC法、活性エステル法、
ウッドワード試薬Kを用いる方法、カルボニルイミダゾール法、酸化還元法、DCC/HONB法、BOP試薬を用いる方法などにより、本発明のペプチドを得ることができる(例えば、Bodanszky, M and M. A. Ondetti, Peptide
Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966)、Schroeder and
Luebke, The Peptide, Academic Press, New York (1965)、F. M. Finn
15 及び K. Hofmann 著、The Proteins、第2巻、H. Nenrath、R. L. Hill
編集、Academic Press Inc., New York (1976)；泉屋信夫他著「ペプチド合成の基礎と実験」丸善(株)1985年；矢島治明、榊原俊平他著、生
化学実験講座1、日本生化学会編、東京化学同人1977年；木村俊他著、
続生化学実験講座2、日本生化学会編、東京化学同人1987年などを参
20 照)。また、自動ペプチド合成装置(PEアプライドバイオシステムズ社
等)により化学合成することもできる。

また、反応後は、公知の精製法により本発明のポリペプチドを精製単離することができる。例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の
25 リペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる本発明の
ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

30 (ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド)

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、本発明のポリペプチドをコードする塩基配列（DNAまたはRNA、好ましくはDNA）を含有するものであればいかなるものであってもよい。このようなポリヌクレオチドとしては、本発明のポリペプチドをコードするDNA、mRNA等のRNAが挙げられ、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（すなわち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（すなわち、非コード鎖）であってもよい。

10 本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997 記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明のポリペプチドのmRNAを定量することができる。

本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織より total RNAまたはmRNA画分を調製したものを
20 用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

本発明のポリペプチドをコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のペプチドをコードするDNAの塩基配列の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅する方法
25 が挙げられる。また適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のポリペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したもののハイブリダイゼーションによって選別し本発明のポリペプチドをコードするDNAのクローニングを行ってもよい。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クロー
30 ニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring

Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、Mut
5 anTM-super Express Km (宝酒造 (株))、Mut a
nTM-K (宝酒造 (株)) 等を用いて、ODA-LA PCR法、Gap
ped duplex法、Kunkel法等の公知の方法あるいはそれら
に準じた方法に従って行なうことができる。

クローン化されたポリペプチドをコードするDNAは、目的によりそ
10 のまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加した
りして使用することができる。このようなDNAは、その5'末端側に
翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コ
ドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これら
の翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを
15 用いて付加することもできる。

本発明のポリペプチドの発現ベクターは、例えば、本発明のポリペプ
チドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、そのD
NA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結すること
により製造することができる。

20 ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pCR4、pCR
2.1、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯
草菌由来のプラスミド (例、pUB110、pTP5、pC194)、
酵母由来プラスミド (例、pSH19、pSH15)、 λ ファージなど
のパクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、パキュ
25 ロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、p
Rc / CMV、pRc / RSV、pcDNA1 / Neoなどが用いられ
る。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿
主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例え
30 ば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV4

0 プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、CHO（dhfr⁻）細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のポリペプチドのN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

- 5 エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K 1 2 ・ D H 1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 6 0 巻, 1 6 0 (1 9 6 8)] , J M 1 0 3 [ヌクレック・アシッツ・リサーチ, (Nucleic Acids Research) , 9 巻, 3
10 0 9 (1 9 8 1)] , J A 2 2 1 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジィ (Journal of Molecular Biology) , 1 2 0 巻, 5 1 7 (1 9 7 8)] , H B 1 0 1 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジィ, 4 1 巻, 4 5 9 (1 9 6 9)] , C 6 0 0 [ジェネティックス (Genetics) , 3 9 巻, 4 4 0 (1 9 5 4)] , D H 5 α [Inoue, H., Nojima,
15 H. and Okayama, H., Gene, 96, 23-28 (1990)] , D H 1 0 B [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 8 7 巻, 4 6 4 5 - 4 6 4 9 (1 9 9 0)] などが用いられる。

- バチルス属菌としては、例えば、バチルス・ズブチルス (*Bacillus subtilis*) M I 1 1 4 [ジーン, 2 4 巻, 2 5 5 (1 9 8 3)] , 2 0 7 - 2 1 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry) , 9 5 巻, 8 7 (1 9 8 4)] などが用いられる。

- 酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) A H 2 2 , A H 2 2 R⁻ , N A 8 7 - 1 1 A , D K D - 5 D ,
25 2 0 B - 1 2 , シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) N C Y C 1 9 1 3 , N C Y C 2 0 3 6 , ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。

- 昆虫細胞としては、例えば、ウイルスが A c N P V の場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell ; S f 細胞) ,
30 *Trichoplusia ni* の中腸由来の M G 1 細胞、*Trichoplusia ni* の卵由来の

High Five™ 細胞、Mamestra brassicae 由来の細胞または Estigmena acrea 由来の細胞などが用いられる。ウイルスが B m N P V の場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N ; B m N 細胞) などが用いられる。その S f 細胞としては、例えば、S f 9 細胞 (ATCC CRL1711)、S f 2 1 細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo) , 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature) , 3 1 5 巻, 5 9 2 (1 9 8 5)〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞 C O S - 7 , V e r o , チャイニーズハムスター細胞 C H O (以下、C H O 細胞と略記)、d h f r 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞 C H O (以下、C H O . (d h f r) 細胞と略記)、マウス L 細胞、マウス A t T - 2 0 、マウスミエローマ細胞、ラット G H 3 、ヒト F L 細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 6 9 巻, 2 1 1 0 (1 9 7 2) やジーン (Gene) , 1 7 巻, 1 0 7 (1 9 8 2) などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics) , 1 6 8 巻, 1 1 1 (1 9 7 9) などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology) , 1 9 4 巻, 1 8 2 - 1 8 7 (1 9 9 1) 、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 7 5 巻, 1 9 2 9 (1 9 7 8) などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology) , 6, 47-55 (1988) などに記載の方法に従って行な

うことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコール、263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52 巻, 456 (1973) に記載の方法に従って
5 行なうことができる。

このようにして、本発明のポリペプチドをコードする DNA を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には
10 その形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、
15 例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地の pH は約 5 ~ 8 が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含む M9 培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクス
20 クスベリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3- β -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

25 宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約 15 ~ 43 °C で約 3 ~ 24 時間行なって、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約 30 ~ 40 °C で約 6 ~ 24 時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、
30 バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、「プロ

シーリングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス
イズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77
巻, 4505 (1980)] や 0.5% カザミノ酸を含有する SD 培地
[Bitter, G. A. ら, 「プロシーリングズ・オブ・ザ・ナショナル・ア
5 カデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl.
Acad. Sci. USA), 81 巻, 5330 (1984)] が挙げられる。培
地の pH は約 5 ~ 8 に調整するのが好ましい。培養は通常約 20℃ ~ 3
5℃ で約 24 ~ 72 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地とし
10 ては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー
(Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した 10% ウシ血清等の添加物を
適宜加えたものなどが用いられる。培地の pH は約 6.2 ~ 6.4 に調
整するのが好ましい。培養は通常約 27℃ で約 3 ~ 5 日間行なって、必
要に応じて通気や攪拌を加える。

15 宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例え
ば、約 5 ~ 20% の胎児牛血清を含む MEM 培地 [サイエンス (Science),
122 巻, 501 (1952)], DMEM 培地 [ヴィロロジー (Virology),
8 巻, 396 (1959)], RPMI 1640 培地 [ジャーナル・オブ・
ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the
20 American Medical Association) 199 巻, 519 (1967)], 19
9 培地 [プロシーリング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイ
オロジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological
Medicine), 73 巻, 1 (1950)] などが用いられる。pH は約 6 ~
8 であるのが好ましい。培養は通常約 30℃ ~ 40℃ で約 15 ~ 60 時
25 間行なって、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発
明のポリペプチドを生成させることができる。

上記培養物から本発明のポリペプチドを分離精製するには、例えば、
下記の方法により行なうことができる。

30 本発明のポリペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際して

は、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるポリペプチドの精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

このようにして得られるポリペプチドが遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するポリペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えることや、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

このようにして生成する本発明のポリペプチドまたはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

(機械刺激感受性チャネル阻害剤)

機械刺激感受性チャネル阻害剤としては、本発明のポリペプチド、もしくはそれらの塩のうちいずれか1つ以上（以下、「本発明のポリペプチド等」ともいう。）を含有するものが挙げられる。本発明のポリペプチド等は、機械刺激感受性チャネル阻害剤として使用できる。本発明のポリペプチド等は、取り扱いが容易であり、後の実施例で示されるように高い阻害活性を有する。

10 (心房細動の治療剤)

心房細動の治療剤としては、本発明のポリペプチド、もしくはその塩のいずれか1つ以上を含有するものが挙げられる。すなわち、本発明によれば、医薬、及び医薬組成物をも提供できる。医薬組成物としては、本発明のポリペプチド、もしくはその塩と、医薬的に許容される担体を
15 含むものがあげられる。

本発明のポリペプチドを含む心房細動の治療剤は、注射液などの形で非経口的に心房の血管等に投与するか、錠剤、カプセル剤など経口投与により使用できる。注射用製剤の場合は単位投与量アンプル又は多投与量容器の状態で提供されてもよい。また、ヒトのみならずヒト以外の哺乳動物に対しても投与することができる。これら製剤化については、公知の製剤化方法を採用することができる。

これらの各種製剤は、製剤上通常用いられる賦形剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、潤滑剤、界面活性剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定化剤、等張化剤等などを
25 適宜選択し、常法により製造することができる。上記各種製剤は、医薬的に許容される担体又は添加物を共に含むものであってもよい。このような担体及び添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサンタンガム、アラビア
30

5 ゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、
ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、
ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、
ラクトースなどが挙げられる。使用される添加物は、本発明の剤型に応
じて上記の中から適宜又は組み合わせて選択される。

上記のような剤型において、活性成分である本発明のポリペプチドは、
剤型中例えば、0.01重量%～100重量%、好ましくは0.1重量%
～90重量%、より好ましくは1重量%～50重量%含まれる。

10 本発明のポリペプチドの投与量は、非経口的に投与する場合は、その
1回投与量は投与対象、症状、投与方法などによっても異なるが、例え
ば、注射剤の形では通常例えば、心房細動患者（60kgとして）にお
いては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～
20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を投与する。経
口投与の場合、例えば、心房細動患者（60kgとして）においては、
15 一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、
より好ましくは約1.0～20mgである。本発明の心房細動の治療剤
は、好ましくは1日1回から数回に分けて1日以上投与される。

（ファルマコフォアの同定）

20 なお、本発明のポリペプチドを設計するに当り、クモ毒ペプチド
（GsMTx-4）のどの部位が活性に必要な最小単位となるファルマコフォア
であるのかを、立体構造に基づいて精度良く予測した。

ファルマコフォアの同定は、例えば以下のようにして行なうことがで
きる。まず、立体構造既知の類縁ペプチドの立体構造を鋳型としたホモ
25 ロジーモデリング法によるクモ毒ペプチドの精密な構造予測を行なう。
その結果、得られた構造に基づいて、活性部位を改変したペプチドの機
能解析を行い、医薬品設計のターゲットとなる部位の絞込みを行なう。
また、GsMTx-4 のジスルフィド結合の部分をミミックした設計を行い、
安定な構造をもつペプチドをデザインする。GsMTx-4 は3つのジスルフ
30 イド結合を持つ比較的柔軟性の低い立体構造を有することが知られてい

るため、一般的に結合に関与することが多い極性アミノ酸残基を含む環状ペプチドをいくつかデザインし、活性に必要なファーマコフォアの同定を行なう。

5 (活性の測定)

本発明のペプチドの活性評価方法としては、公知の活性評価方法を用いることができるが、好ましくは実施例 1 に記載されたパッチクランプ法による単一チャネル電流記録法を用いることができる。

10 (実施例 1)

実験例 1 : クモ毒ペプチド (GsMTx-4) 配列と一致度の高い構造既知の類縁ペプチドの検索

配列番号 4 で表される GsMTx-4 のアミノ酸配列と一致度の高い構造について、PDB (タンパク質立体構造データベース) からクモ毒を対象
15 に検索した。この結果、GsMTx-4 と相同性の高い 10 の候補が上がった。これら候補のマルチプルアライメントの結果を以下の図 1 に示す。

図 1 に示す配列の中から、システイン残基が一致していて、なおかつシステイン残基間の長さがほぼ等しく、挿入欠失のない (GsMTx4 の方が 1 残基長い) 1QK6 (Huwentoxin-I: 配列番号 12) を鋳型として選択し、
20 ホモロジーモデリング法によりファーマコフォアの絞込みを行った。

実施例 2 : クモ毒ペプチド (GsMTx-4) の立体構造予測

鋳型ペプチド 1QK6 を用いてホモロジーモデリングを行った。まず、1QK6 と GsMTx-4 とのアラインメントを行った。その結果を図 2 に示す。

25 次に、プログラム MODELLER を用いてモデル構造の構築を行った。構築した GsMTx-4 の構造モデルと鋳型に用いた Huwentoxin-I との重ね合わせた結果を図 3 および図 4 に示す。図 3 は、Huwentoxin-I と GsMTx-4 を重ね合わせたステレオ図である。図 4 は、Huwentoxin-I と GsMTx-4 を重ね合わせたモデルの C α トレースを示す。図 4 中、薄い線は鋳型を表し、
30 濃い線は GsMTx-4 を表す。

また、図 5 には Huwentoxin-I で活性中心と考えられる Arg20 近傍の様子を示す。図 5 中、薄い線は huwentoxin-I を表し、濃い線は GsMTx-4 を表す。さらに、Huwentoxin-I と GsMTx-4 の表面構造を比較した結果を図 6 に示す。図 6 (a) ~ 図 6 (d) において、左が huwentoxin-I、右が GsMTx-4 を表す。図 6 (a) は、hydrophobic patch から見たもの（上の図とほぼ同じ向き）を表す。図 6 (b) は、x 軸の周りに +90° 回転したものを表す。図 6 (c) は、y 軸の周りに +90° 回転したものを表す。図 6 (d) は、y 軸の周りに 180° 回転したものを表す。図 6 (b) から両ペプチドの分子の形状はかなり異なっていることがわかる。また解離性側鎖を持つ残基の分布も異なっており、特異性決定に関係していることが推測できる。

また、Robert et.al, J. Biol. Chem. Vol37, pp3443-34450, 2002. (上記非特許文献 3) に開示された GsMTx-4 の NMR による溶液中の構造と、本実施例により求められた GsMTx-4 の構造を比較すると、本発明において構築したモデリング構造は、実際の GsMTx-4 の構造を反映していると判断できる。

実施例 3：活性ペプチドのデザインとファーマコフォアの同定

上述の GsMTx-4 のモデリング構造に基づいてペプチド断片のおおよその設計方針を決定した。図 7 に、GsMTx-4 の構造およびデザインしたペプチドの構造を表す。GsMTx-4 は、3 つのジスルフィド結合により、図 7 の配列構造式に示すように 4 つのループ部分から成っている。したがって、GsMTx-4 のどのループ部分が阻害活性に寄与する部分であるかを調べるために TVP001 から TVP005 の 5 つのペプチドをデザインした。これらのペプチドについては、ループを構成しない部位にあるシステインをアラニンに置換している。TVP001 (配列番号 14) はループ 1 と 2、TVP002 (配列番号 15) はループ 3 と 4、TVP003 (配列番号 1) はループ 2、TVP004 (配列番号 2) はループ 3、TVP005 (配列番号 3) はループ 2 と 3 から成っている。

(デザインしたペプチドのバイオアッセイ)

ペプチドの活性評価には、最も信頼性の高いパッチクランプ法による単一チャネル電流記録法を用いた。アッセイの対象としては、心筋由来の Ca^{2+} 依存性 BigK チャネル (Kawakubo et. Am J Physiol, 276:H1827. 1999) を用いた。このチャネルを、発現しているニワトリの心室筋、もしくはこのチャネルの cDNA を強制発現した CHO 細胞にセルアタッチトパッチクランプ法を適用した後、inside-out 引きちぎりパッチ膜 (excised patch) を形成し、膜電位固定下で単一チャネル電流を計測した。デザインした合成ペプチドは GsMTx-4 と同様、細胞外からチャネルをブロックするものと想定し、予め記録用ガラスピペットの一定位置以上の空間に既知濃度のペプチドを充填して、拡散によりチャネルに到達させるバックフィル (back-fill) を用いて投与した。この手法では拡散開始後おおよそ 15-20 分でピペット内ペプチド濃度が平衡に達するので、20 分後の抑制率からペプチドの解離定数を推定できる。あるいは抑制の時間経過からペプチドの相対的抑制力を推定することもできる。ペプチドの正確な解離定数を求めるには、outside-out の引きちぎりパッチ膜を形成して単一チャネル電流を計測し、種々の濃度のペプチドによる抑制効果を解析して用量-抑制曲線を求めなければならないが、この方法は格段の技術を要すること、今回は種々のデザインした合成ペプチドの一次スクリーニングであることから、前述の inside-out 引きちぎりパッチにバックフィルを組み合わせたアッセイ法を使って、ペプチドの抑制効果について、おおよその見積もりを行った。ペプチドの濃度としては、GsMTx-4 での結果を考慮して $10\mu\text{M}$ を用いた。評価量としては、チャネルの開確率 (P_0 、パーセント表示) を用い、抑制の強さはコントロール (ペプチド投与前) を基準とした抑制率 (パーセント)、あるいは抑制の時間経過で表現した。

(アッセイ結果)

デザインした 5 種類の合成ペプチドのうち、TVP003、TVP004、TVP005、に阻害活性が認められた。そこで、TVP0004 の N 末端から 3 番目の R を A

に置換した変異体 TVP017（配列番号：16）、および TVP0004 の N 末端から 7 番目の K を A に置換した変異体 TVP019（配列番号：17）を合成し、上記のバイオアッセイにより阻害活性を測定したところ、これらの合成ペプチドにも阻害活性が認められた。

- 5 図 8 は、TVP003 の阻害活性検査結果を示す。図 8（a）は、単一チャンネル電流の計測結果を表す図である。図 8（b）は、チャンネルの開確立（P o）を表す。図 8 に示すように、TVP003 は 8 分後にはほぼ 100% の抑制効果を示したことから、TVP003 の解離定数は μ M オーダーかそれ以下であると推定された。この値は、TVP003 が、天然のクモ毒ペプチド
- 10 GsMTx-4 と同等かそれ以上の阻害活性を有することを示唆している。

図 9 は、TVP004 の阻害活性検査結果を示す図である。図 9（a）は、単一チャンネル電流の計測結果を表す。図 9（b）は、チャンネルの開確立（P o）を表す。図 9 に示すように TVP004 は 10μ M で 8 分後には約 60%、16 分後には 95% の阻害活性を示し、比較的強い阻害活性を示した。

- 15 図 10 は、TVP005 の阻害活性検査結果を示す図である。図 10（a）は、単一チャンネル電流の計測結果を表す。図 10（b）は、チャンネルの開確立（P o）を表す。図 10 に示すように、TVP005 は、20 分後に約 60% の阻害効果を示したことから、その解離定数はおよそ 10μ M 程度と推定された。

- 20 図 11 は、TVP017 の阻害活性検査結果を示す。図 11（a）は、単一チャンネル電流の計測結果を表す図である。図 11（b）は、チャンネルの開確立（P o）を表す。図 11 に示すように、TVP017 は 6 分後にはほぼ 100% の抑制効果を示したことから、TVP003 よりさらに優れた抑制効果を示すことが分かった。この値は、TVP017 が、天然のクモ毒ペプチド
- 25 GsMTx-4 以上の阻害活性を有することを示唆している。

図 12 は、TVP019 の阻害活性検査結果を示す。図 12（a）は、単一チャンネル電流の計測結果を表す図である。図 12（b）は、チャンネルの開確立（P o）を表す。図 12 に示すように、TVP017 は 14 分後にはほぼ 80% の抑制効果を示した。

(2) ペプチドのチャネルに対する特異性について

実施例 4：活性ペプチドの機械刺激感受性チャネルに対する特異性

本発明の活性ペプチドの機械刺激感受性チャネルに対する特異性について検討した。活性ペプチドとして TVP0003 を用い、チャネルには、実施例 3 で用いたチャネルと同じ心筋 SA チャネルを使用した。このチャネルは C 末に 59 アミノ酸からなる STREX 配列を有しており、これを除去した変異体 (STREX-deletion-mutant) は、伸展活性をほとんど失い、ごく一般的な Ca 依存性 bigK チャネルとなる (SAKCA: Tang, Naruse, Sokabe, J Membr Biol, 169:185-200, 2003)。図 1 3 は、活性ペプチドの機械刺激感受性チャネルに対する特異性の検討結果を示すグラフである。図 1 3 (a) は、TVP0003 の心筋 SA チャネルに関する単一チャネル電流の測定結果を示すグラフである。図 1 3 (b) は、TVP0003 の STREX-deletion-mutant に関する単一チャネル電流の測定結果を示すグラフである。図 1 3 (c) は、チャネルの開確立 (P_o) を表すグラフである。図 1 3 から、GsMTx-4 および TVP003 は、野生型の SA チャネル抑制するのに対し、STREX-deletion-mutant をほとんど抑制しないことがわかる。従って、GsMTx-4 および TVP003 は、伸展活性を有するチャネルにのみ特異的に作用すると考えられる。

20 産業上の利用可能性

本発明によれば、機械刺激感受性チャネルの活性を特異的に阻害する新規ポリペプチドを得ることができる。

このような本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、そのポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、その組換えベクターで形質転換させた形質転換体を用いれば、本発明のポリペプチドを大量に生産できる。

本発明のポリペプチド、または本発明のポリペプチドの塩を含有する機械刺激感受性チャネル阻害剤は、機械刺激感受性チャネルに関する試薬を製造する際に有効である。

30 本発明のポリペプチド、または本発明のポリペプチドを含有する心房

細動の治療剤は、心房細動を効果的に治療することができる。

請求の範囲

1. 配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩。
- 5 2. 配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩。
3. 配列番号 16、または配列番号 17 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩。
4. 配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3 で表されるアミノ酸
10 配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列からなるものではなく、かつ機械刺激感受性チャネル阻害活性を有するポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩。
5. 前記「配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3 で表されるアミ
15 ノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列からなるものではなく、かつ機械刺激感受性チャネル阻害活性を有するポリペプチド」が、配列番号 16、または配列番号 17 で表されるア
ミノ酸配列からなるポリペプチドである請求項 4 に記載のポリペプチド、
20 または当該ポリペプチドの塩。
6. 請求項 1、請求項 3、又は請求項 4 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
7. 請求項 6 に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
8. 請求項 7 に記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。
- 25 9. 請求項 1～請求項 5 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩のうちいずれか 1 つ以上を含有する機械刺激感受性チャネル阻害剤。
10. 請求項 1～請求項 5 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩のうちいずれか 1 つ以上を含有する心房細動の治
30 療剤。

Fig. 1

1QDP__	—CAKKRNWCG—KNEDCCCP—MKCIYAWYNQQGSCQTTITGLFKKC	配列番号 5
1VTX__	—CAKKRNWCG—KTEDCCCP—MKCVYAWYNEQGSCQSTISALWKKC	配列番号 6
1EMX_A	—DDCGKLFSGCD—TNADCCEG—YVCR———LWCK—LD—W——	配列番号 7
1QK7_A	—GC—LGDKCD—YNNGCCSG—YVCSRTW——KWCV—LAGPW——	配列番号 8
1EIU__	—ACVGENQQCADW—AGPHCCDG—YYCTCRYF—PKCICRNNN——	配列番号 9
1EIV__	—ACVGENQQCADW—AGPHCCDG—YYCTCRYF—PKCICRNNN——	配列番号 10
1EIT__	—ECVPENGHCRDW—YD—ECCEG—FYCSCRQP—PKCICRNNNX——	配列番号 11
1QK6_A	—ACKGVFDACTP—GKNECCPN—RVCSDKH——KWCKWKL——	配列番号 12
GSMTX4	—GCLEFWWKCNP—NDDKCCRPKLKCSKLF——KLCNFSSG——	配列番号 4
1I25_A	LF ECS—FSCEIEKEGDKPCKK—KKCKGGW——KCKFNMCKVKV——	配列番号 13

Fig. 2

1QK6 と GSMTX-4 とのアライメント

1QK6	ACKGVFDACTPGKNECC—PNRVCSDKHKWCKWKL—	配列番号 12
GSMTX4	GCLEFWWKCNPNDDKCCRPKLKCSKLFKLCNFSSG	配列番号 4
.* .: *.*.::** *: **. *.*::.		% identity: 30.3

(アラインメント: Clustalw 1.81)

Fig. 3

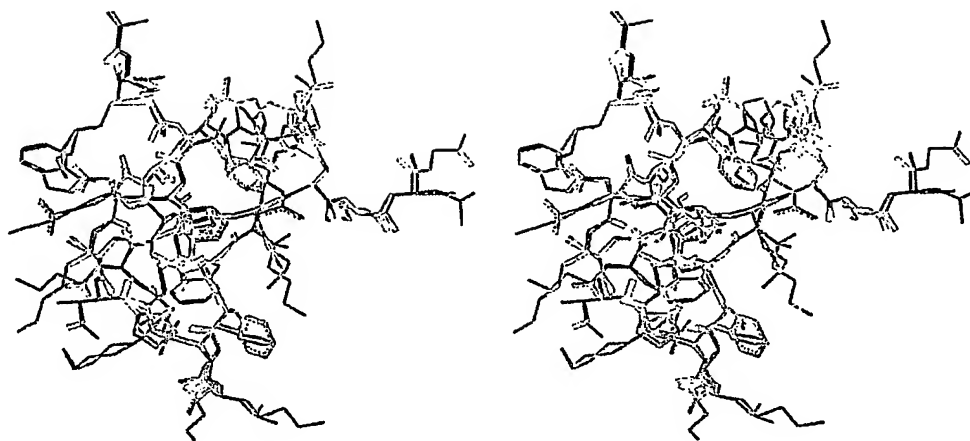


Fig. 4

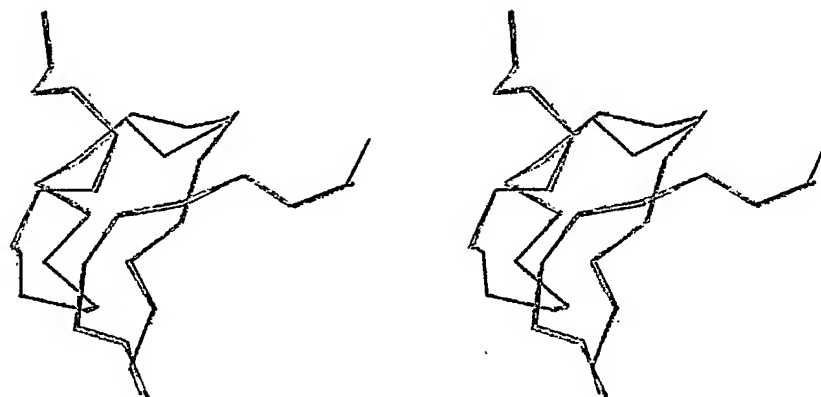


Fig. 5

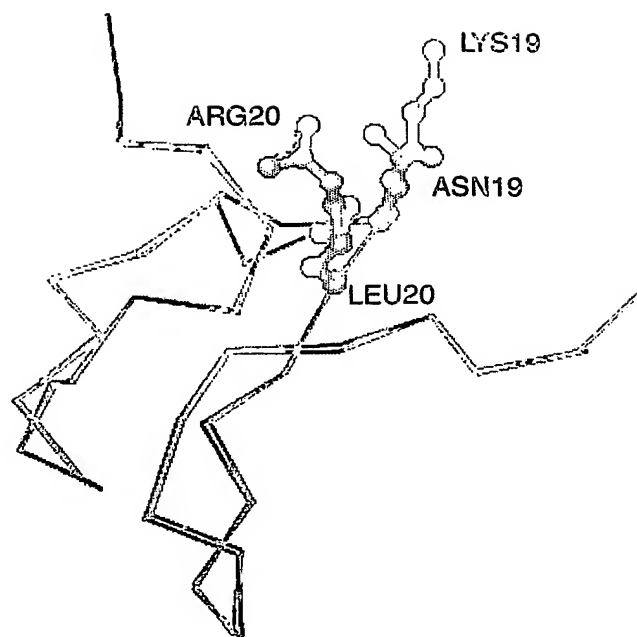
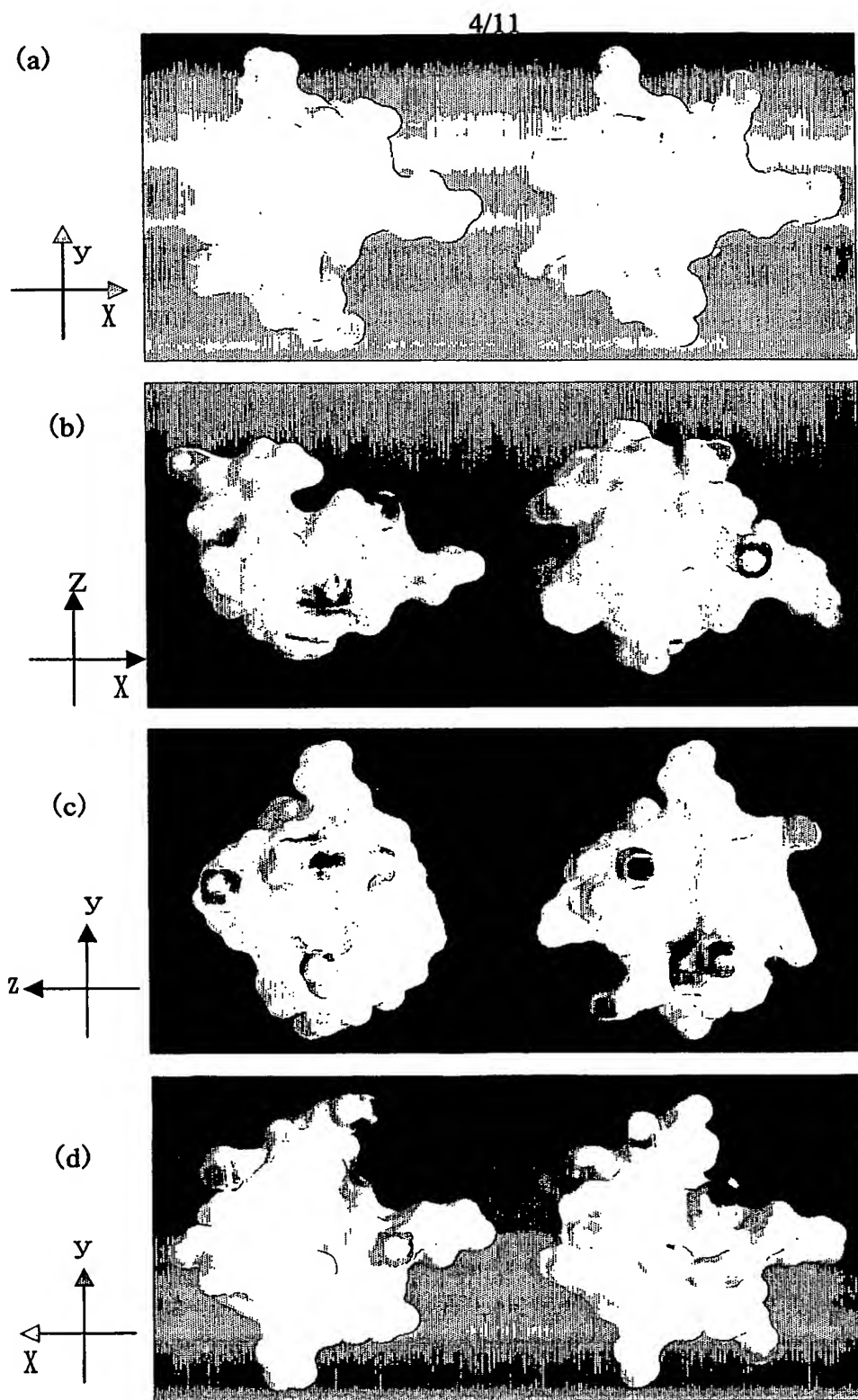
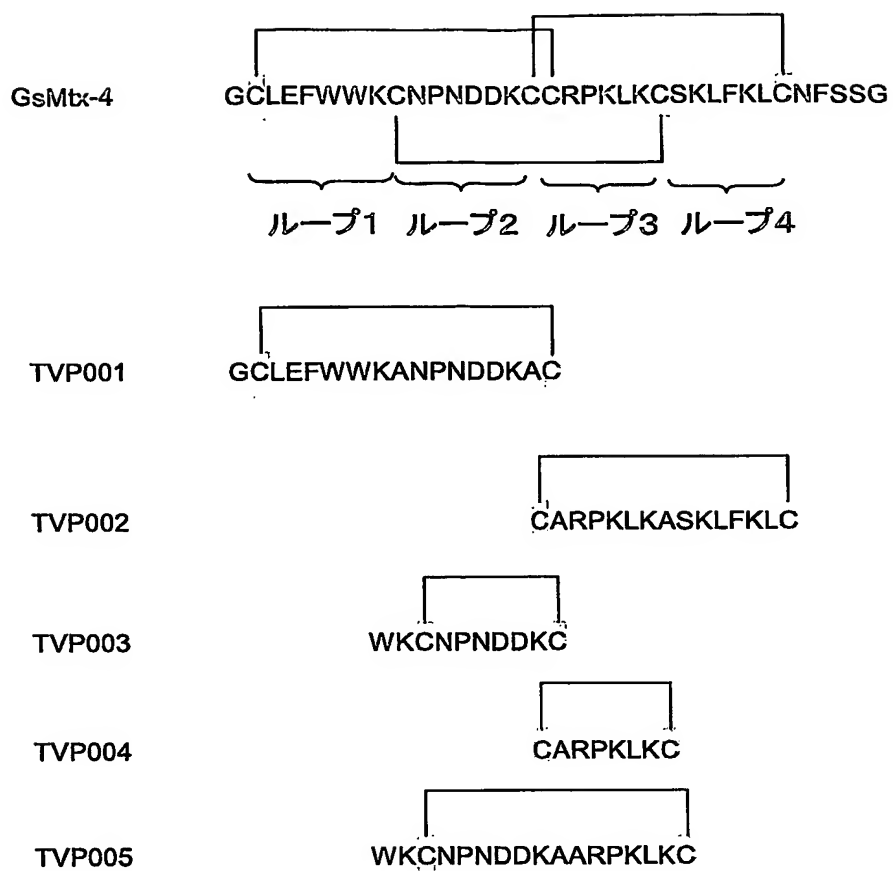


Fig.6



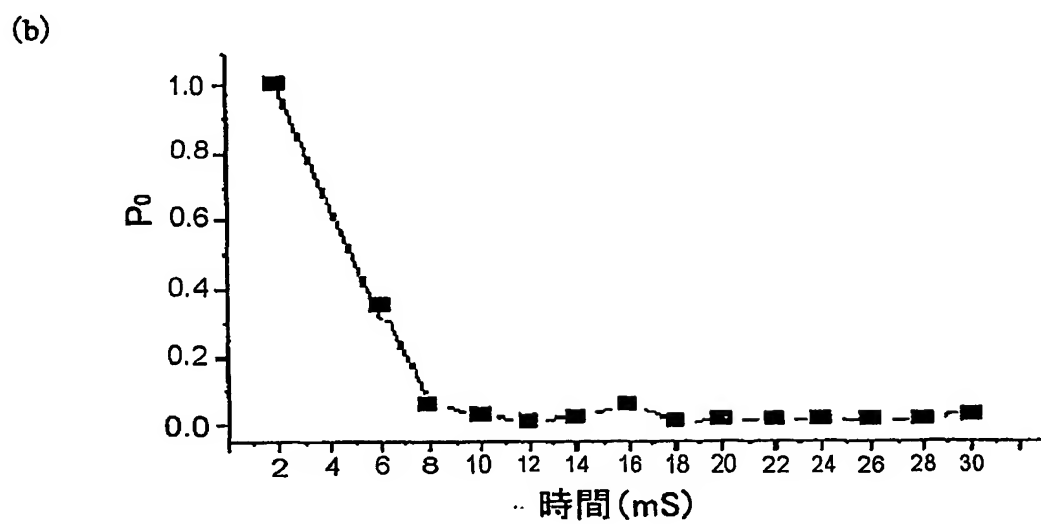
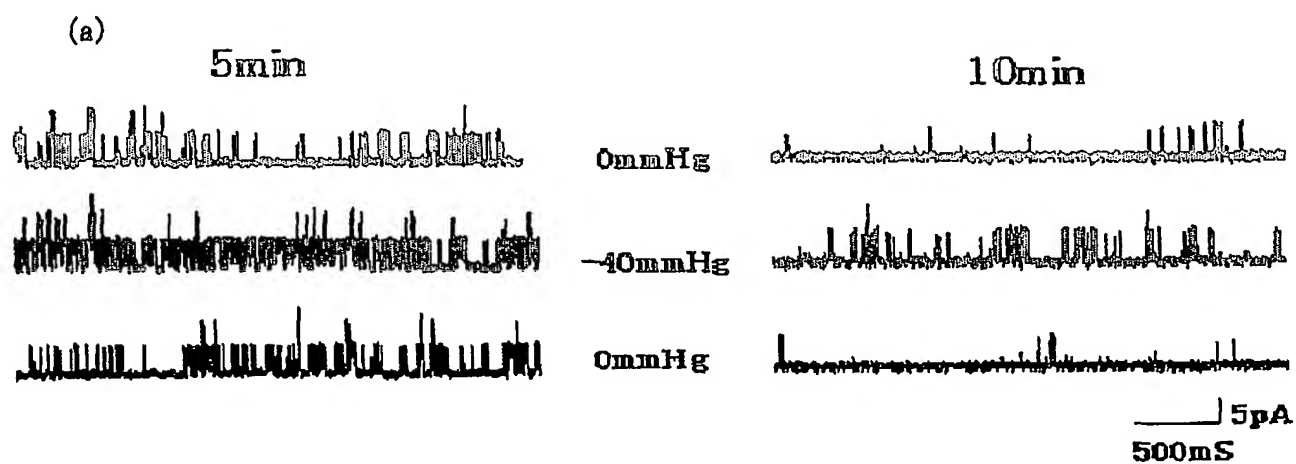
5/11

Fig.7



6/11

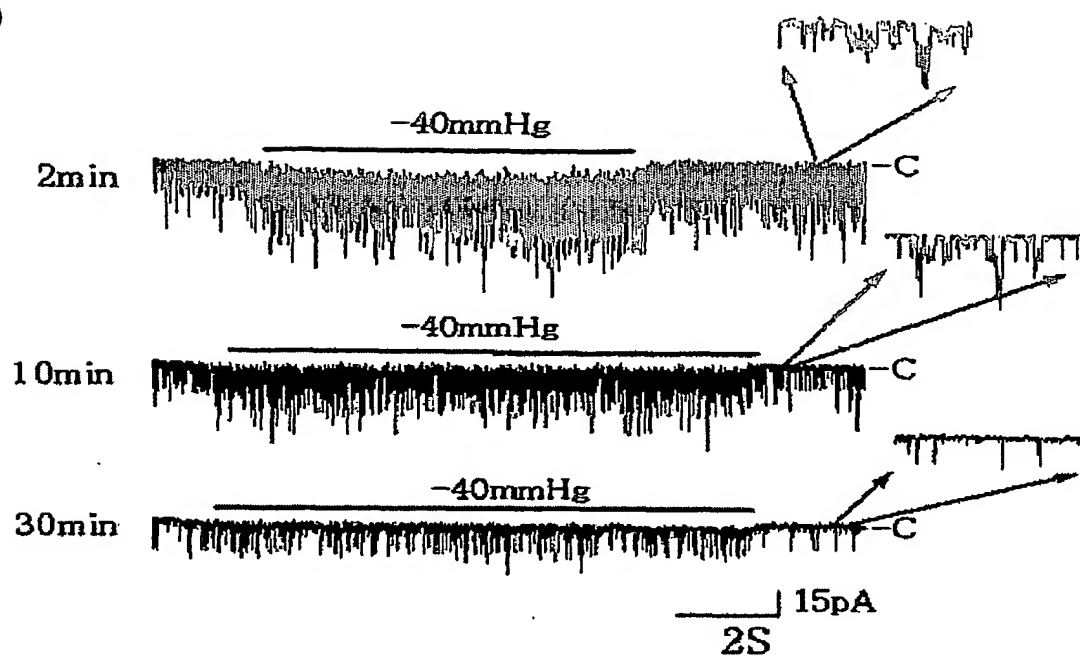
Fig.8



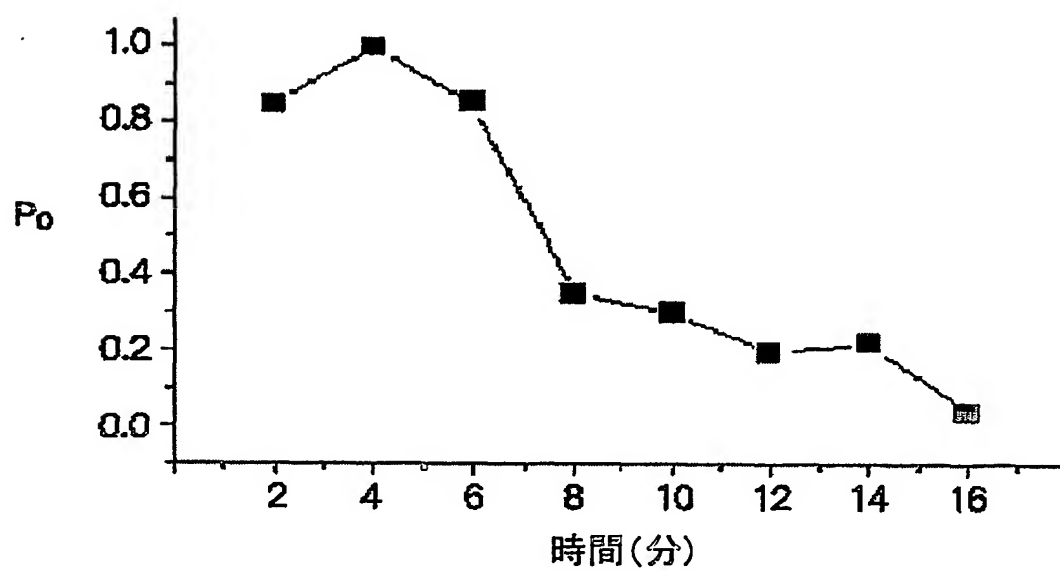
7/11

Fig.9

(a)



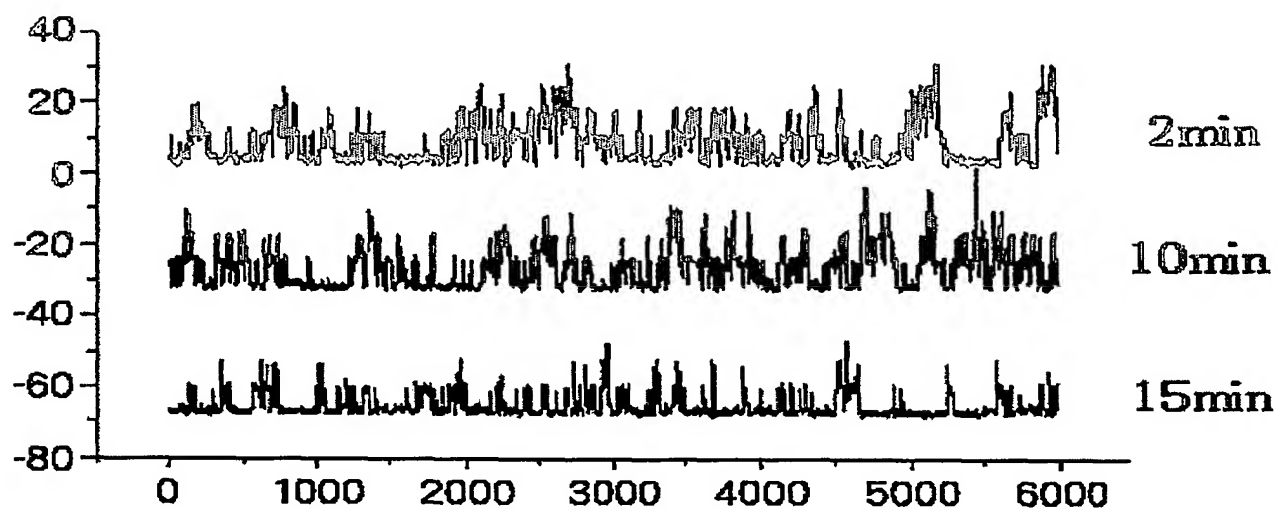
(b)



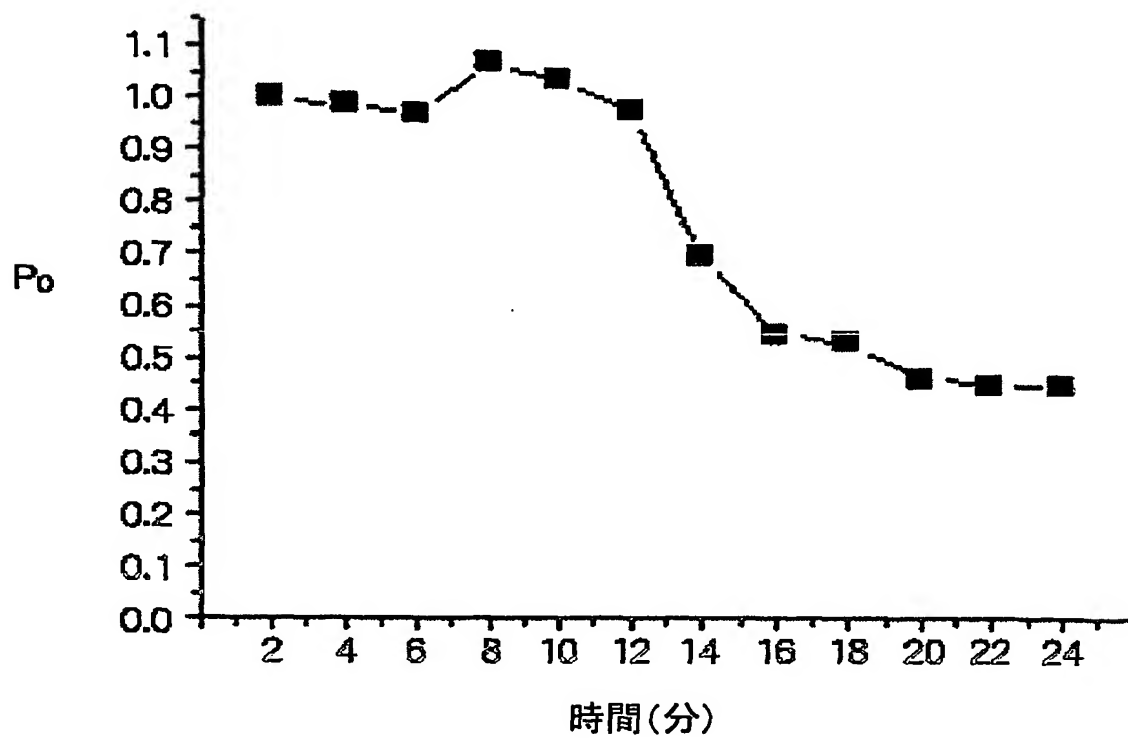
8/11

Fig.10

(a)

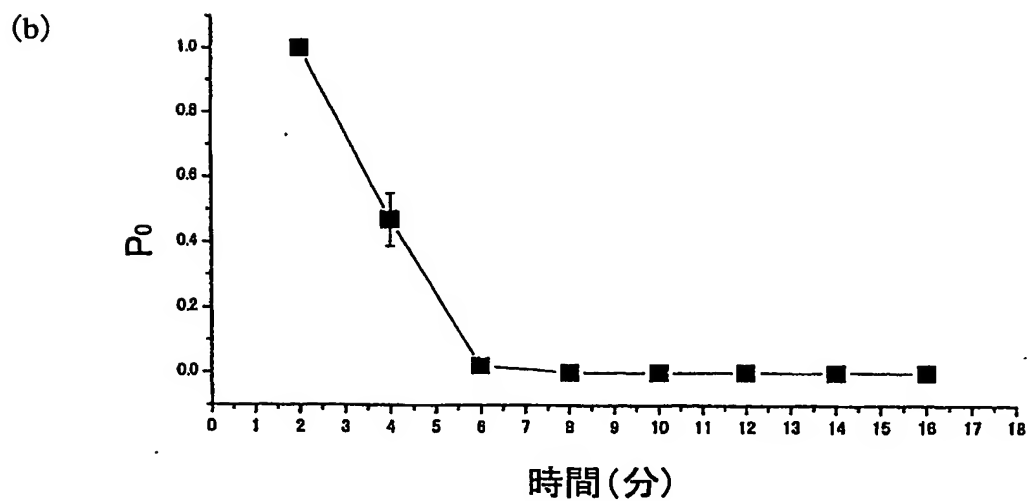
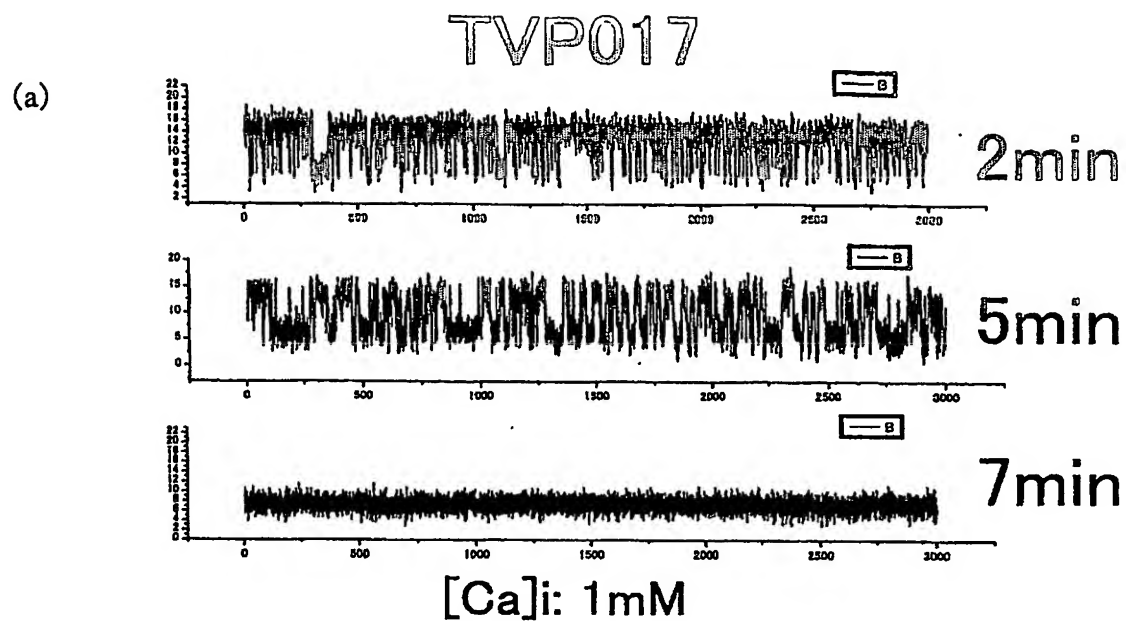


(b)



9/11

Fig.11



10/11

Fig.12

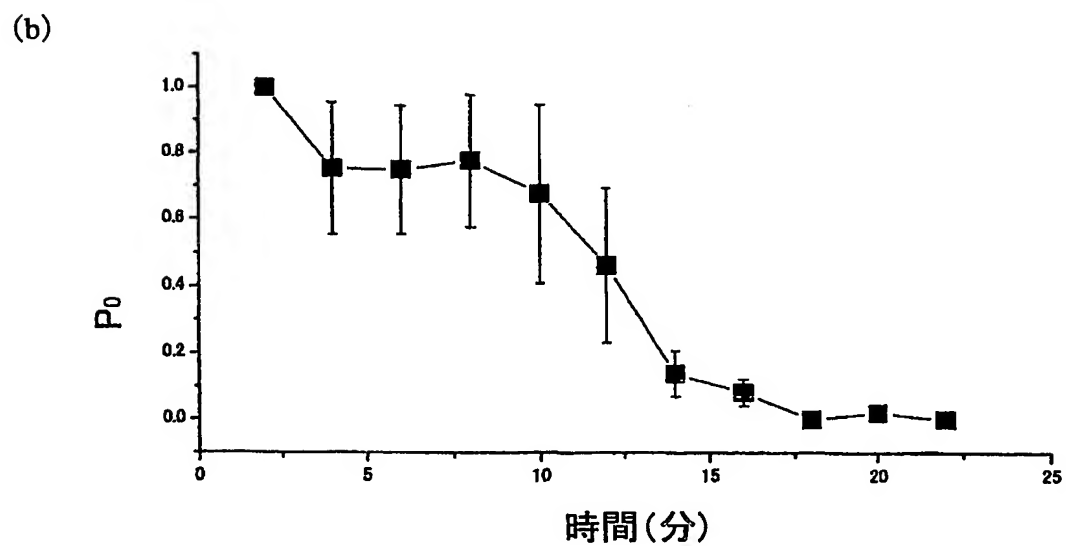
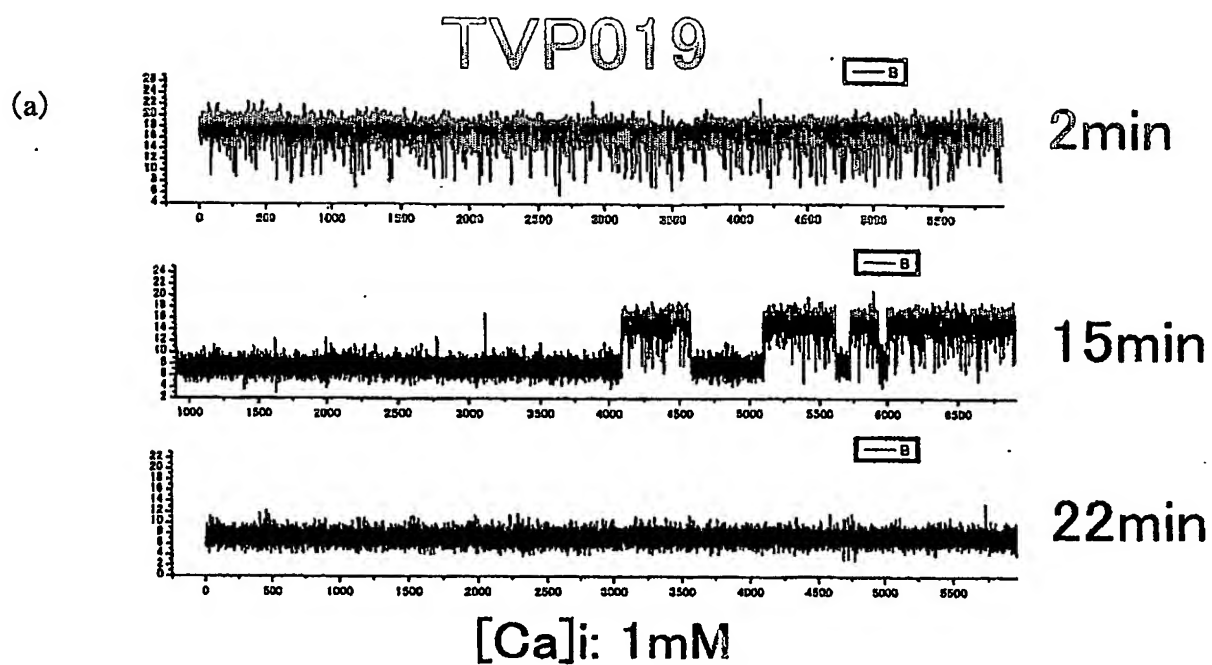
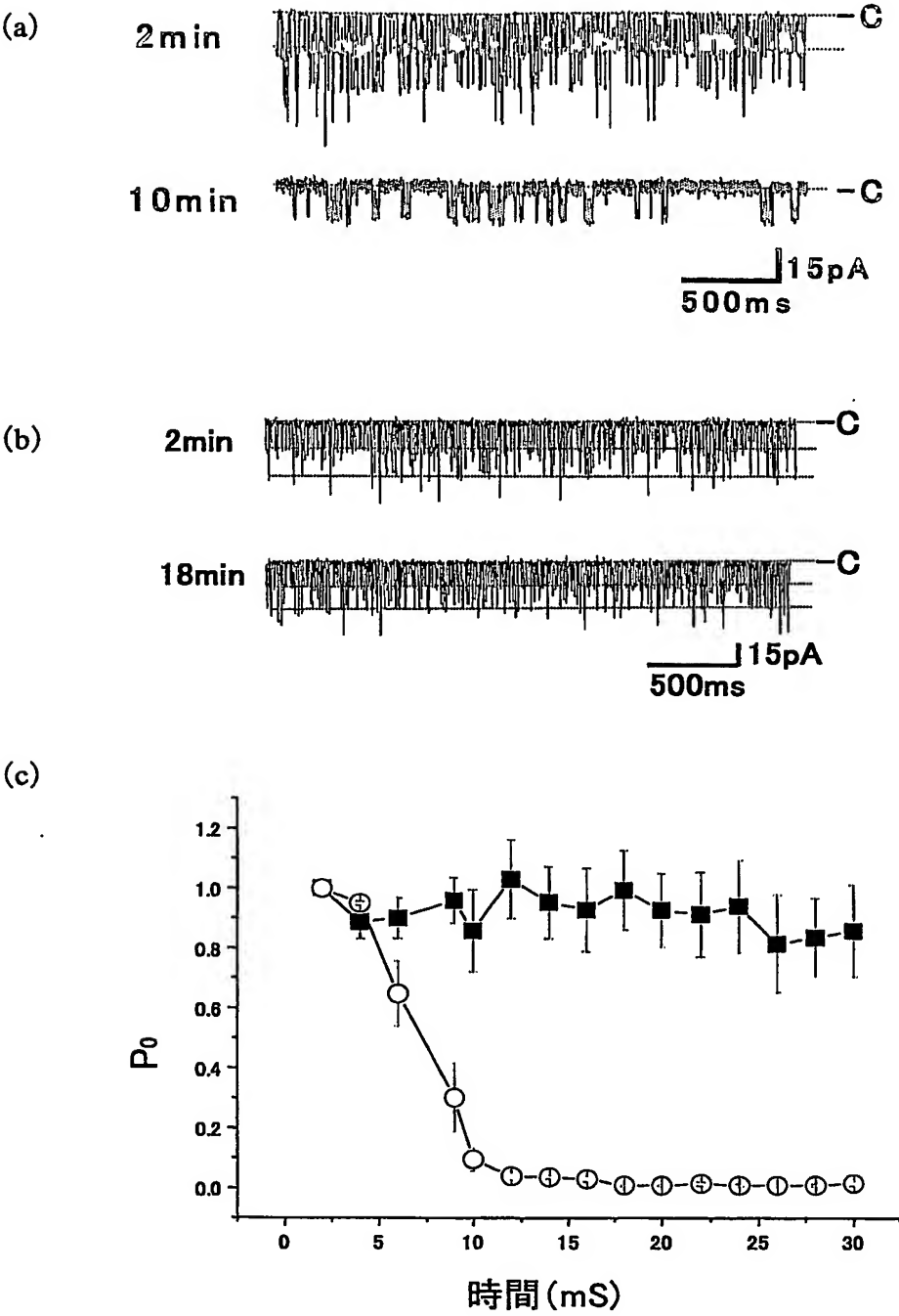


Fig.13



1/8

SEQUENCE LISTING

<110> Pharmadesign, Inc.

<120> Low Molecule Polypeptide for Active Channel Blocker

<130> P03-0030PCT

<140>

<141>

<150> 2003-085666

<151> 2003-03-26

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Polypeptide

<400> 1

Trp Lys Cys Asn Pro Asn Asp Asp Lys Cys

1

5

10

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

2/8

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Polypeptide

<400> 2

Cys Ala Arg Pro Lys Leu Lys Cys
1 5

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Polypeptide

<400> 3

Trp Lys Cys Asn Pro Asn Asp Asp Lys Ala Ala Arg Pro Lys Leu Lys
1 5 10 15

Cys

<210> 4

<211> 35

<212> PRT

<213> Grammostola spatulata

<400> 4

Gly Cys Leu Glu Phe Trp Trp Lys Cys Asn Pro Asn Asp Asp Lys Cys
1 5 10 15

3/8

Cys Arg Pro Lys Leu Lys Cys Ser Lys Leu Phe Lys Leu Cys Asn Phe
20 25 30

Ser Ser Gly
35

<210> 5

<211> 42

<212> PRT

<213> Atrax robustus

<400> 5

Cys Ala Lys Lys Arg Asn Trp Cys Gly Lys Asn Glu Asp Cys Cys Cys
1 5 10 15

Pro Met Lys Cys Ile Tyr Ala Trp Tyr Asn Gln Gln Gly Ser Cys Gln
20 25 30

Thr Thr Ile Thr Gly Leu Phe Lys Lys Cys
35 40

<210> 6

<211> 42

<212> PRT

<213> Hadronyche versuta

<400> 6

Cys Ala Lys Lys Arg Asn Trp Cys Gly Lys Thr Glu Asp Cys Cys Cys
1 5 10 15

Pro Met Lys Cys Val Tyr Ala Trp Tyr Asn Glu Gln Gly Ser Cys Gln
20 25 30

Ser Thr Ile Ser Ala Leu Trp Lys Lys Cys

4/8

35

40

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

<213> Heteropodidae veratoria

<400> 7

Asp Asp Cys Gly Lys Leu Phe Ser Gly Cys Asp Thr Asn Ala Asp Cys

1

5

10

15

Cys Glu Gly Tyr Val Cys Arg Leu Trp Cys Lys Leu Asp Trp

20

25

30

<210> 8

<211> 32

<212> PRT

<213> Selenocosmia huwena

<400> 8

Gly Cys Leu Gly Asp Lys Cys Asp Tyr Asn Asn Gly Cys Cys Ser Gly

1

5

10

15

Tyr Val Cys Ser Arg Thr Trp Lys Trp Cys Val Leu Ala Gly Pro Trp

20

25

30

<210> 9

<211> 37

<212> PRT

<213> Agelenopsis aperta

5/8

<400> 9

Ala Cys Val Gly Glu Asn Gln Gln Cys Ala Asp Trp Ala Gly Pro His

1

5

10

15

Cys Cys Asp Gly Tyr Tyr Cys Thr Cys Arg Tyr Phe Pro Lys Cys Ile

20

25

30

Cys Arg Asn Asn Asn

35

<210> 10

<211> 37

<212> PRT

<213> Agelenopsis aperta

<400> 10

Ala Cys Val Gly Glu Asn Gln Gln Cys Ala Asp Trp Ala Gly Pro His

1

5

10

15

Cys Cys Asp Gly Tyr Tyr Cys Thr Cys Arg Tyr Phe Pro Lys Cys Ile

20

25

30

Cys Arg Asn Asn Asn

35

<210> 11

<211> 37

<212> PRT

<213> Agelenopsis aperta

<220>

<221> UNSURE

<222> (37)

6/8

<223> Xaa represents unknown amino acid residue

<400> 11

Glu Cys Val Pro Glu Asn Gly His Cys Arg Asp Trp Tyr Asp Glu Cys

1

5

10

15

Cys Glu Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Gln Pro Pro Lys Cys Ile Cys

20

25

30

Arg Asn Asn Asn Xaa

35

<210> 12

<211> 33

<212> PRT

<213> Selenocosmia huwena

<400> 12

Ala Cys Lys Gly Val Phe Asp Ala Cys Thr Pro Gly Lys Asn Glu Cys

1

5

10

15

Cys Pro Asn Arg Val Cys Ser Asp Lys His Lys Trp Cys Lys Trp Lys

20

25

30

Leu

<210> 13

<211> 37

<212> PRT

<213> Selenocosmia huwena

<400> 13

Leu Phe Glu Cys Ser Phe Ser Cys Glu Ile Glu Lys Glu Gly Asp Lys

7/8

1

5

10

15

Pro Cys Lys Lys Lys Lys Cys Lys Gly Gly Trp Lys Cys Lys Phe Asn

20

25

30

Met Cys Val Lys Val

35

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Polypeptide

<400> 14

Gly Cys Leu Glu Phe Trp Trp Lys Ala Asn Pro Asn Asp Asp Lys Ala

1

5

10

15

Cys

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Polypeptide

<400> 15

8/8

Cys Ala Arg Pro Lys Leu Lys Ala Ser Lys Leu Phe Lys Leu Cys
1 5 10 15

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Polypeptide

<400> 16

Cys Ala Ala Pro Lys Leu Lys Cys
1 5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Polypeptide

<400> 17

Cys Ala Arg Pro Lys Leu Ala Cys
1 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004190

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/435, A61K38/08, A61K38/10, A61P9/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-15/90, C07K14/00-16/46, C12N1/00-9/99,
A61K31/00-48/00, A61P1/00-43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (STN),
BIOSIS (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	Thomas M. et al., "Identification of a Peptide Toxin from Grammostola spatulata Spider Venom that Blocks Cation-selective Stretch-activated Channels", The Journal of General Physiology Vol.115, No.5, (2000), pages 583 to 598	2/1, 4, 6-10 /3, 5
X/Y/A	WO 01/76618 A1 (Univ. New York State Res. Found., 18 October, 2001 (18.10.01), & US 2002/0077286 A1	2/1, 4, 6-10 /3, 5
Y	Bode F. et al., "Tarantula peptide inhibits atrial fibrillation.", Nature, Vol.409, No.6816, (2001), pages 35 to 36	9, 10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 May, 2004 (20.05.04)

Date of mailing of the international search report

08 June, 2004 (08.06.04)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004190

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Owen White et al., "Genome Sequence of the Radioresistant Bacterium Deinococcus radiodurans R1.", Science, Vol.286, (1999), pages 1571 to 1577	4, 6-8
A	Russell, S.R.H. et al., "Drosophila melanogaster male germ line-specific transcripts with autosomal and Y-linked genes.", Genetics, Vol.134, (1993), pages 293 to 308	4-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N 15/12, C07K 14/435, A61K 38/08, A61K 38/10, A61P 9/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N 15/00~15/90, C07K 14/00~16/46, C12N 1/00~9/99, A61K 31/00~48/00, A61P 1/00~43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y/A	Thomas M. et al., "Identification of a Peptide Toxin from Grammostola spatulata Spider Venom that Blocks Cation-selective Stretch-activated Channels." The Journal of General Physiology, Vol. 115, No. 5, (2000), p. 583-598	2/1, 4, 6-10 / 3, 5
X/Y/A	WO 01/76618 A1 (Univ. New York State Res. Found.) 2001.10.18 & US 2002/0077286 A1	2/1, 4, 6-10 / 3, 5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20.05.2004

国際調査報告の発送日

08.6.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齊藤真由美

4 B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Bode F, et al., " Tarantula peptide inhibits atrial fibrillation. " Nature. Vol. 409, No. 6816, (2001), p. 35-36.	9, 10
A	Owen White, et al., " Genome Sequence of the Radioresistant Bacterium Deinococcus radiodurans R1. " Science, Vol. 286, (1999), p. 1571-1577	4, 6 - 8
A	Russell, S. R. H. et al., "Drosophila melanogaster male germ line-specific transcripts with autosomal and Y-linked genes. " Genetics, Vol. 134, (1993), p. 293-308	4 - 8